



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑩ **DE 196 48 629 A 1**

②① Aktenzeichen: 196 48 629.7
②② Anmeldetag: 12. 11. 96
④③ Offenlegungstag: 14. 5. 98

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/53
G 01 N 33/569
G 01 N 33/577
C 12 P 21/08
C 07 K 16/10
// C12Q 1/42, 1/28,
1/34

DE 196 48 629 A 1

⑦① Anmelder:
Meisegeier, Bernhard, Dr., 97209 Veitshöchheim,
DE

⑦② Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur immunologischen Erfassung und Produktion von Antikörpern

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Testkit zur Bestimmung der Anwesenheit und/oder der Konzentration isotypspezifischer Antikörper gegen multiterminale Antigene in Körperflüssigkeiten und ein Verfahren zur Produktion monoklonaler Antikörper. Es wird ein Verfahren zur Verminderung ungewollt unspezifischer Reaktionen durch Unterbindung der Reaktionen koimmobilisierter Rezeptoren und/oder durch Konkurrenzreaktionen unspezifischer Faktoren mit Rezeptoren auf Testbestandteilen und/oder durch Hemmung der ungewollten Reaktionen unspezifischer Faktoren und ein diesbezüglicher langzeitstabilisierter Testkit beschrieben.

DE 196 48 629 A 1

5 Das Verfahren findet vorrangig Anwendung zum antigenspezifischen in-vitro- Nachweis oder zur Bestimmung eines immunologisch aktiven Reaktionspartners mittels immunologischer Methoden und zur Herstellung von Testsätzen für Immunoassays, die insbesondere in der Medizin, Pharmazie, Mikrobiologie angewendet werden. Die Technologie wird zur Massenproduktion monoklonaler Antikörper genutzt.

10 Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Massenproduktion monoklonaler Antikörper beschreiben J.H. Peters, H. Baumgarten, M. Schulze ("Monoklonale Antikörper", Herstellung und Charakterisierung. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York) neben der intraperitonealen Applikation der Hybridomzellen in syngene Mäuse und anschließender Gewinnung der Ascitesflüssigkeit die
15 Propagation der Hybridomzellen mittels Zellkulturtechnik.

Während die Produktion monoklonaler Antikörper in Ascitesflüssigkeit nicht frei von Bedenken ist, lassen sich in dem Zellkulturüberstand nur relativ geringe Antikörperkonzentrationen erzielen.

Der Nachweis oder die Bestimmung von immunologisch aktiven Proteinen (wie Antigene, Haptene, Antikörper) erfolgt vorzugsweise mittels immunologischer Methoden, die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen, die sich
20 durch hohe Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit auszeichnen.

Für solche Immunreaktionen werden spezifisch reagierende Antigene und Antikörper, ein Indikatorsystem, spezielle Medien für die Reaktion der Reaktionspartner und in der Regel Kontrollmaterialien benötigt. Für die Bindungsreaktionen werden Festphasentechniken bevorzugt, weil sich die Reaktionsprodukte leicht abtrennen lassen.

Zur Erfassung des Maßes der spezifischen Bindungsreaktion wird eine Indikatorreaktion wie z. B. Farb-, Fluoreszenz-, Bio- oder Chemilumineszenzreaktion angewendet. (E.Engvall, P.Permann, Immunochemistry 8, 871 (1971); B.K.van Weemen, A.H.M.Schuurs, FEBS Letters 15, 232(1971); E.Ishikawa, T.Kawai, K.Miyai, Enzymimmunoassay, Igaku-Shoin, Tokyo, New York 1981); R.H.Yolken Rev.Infect Dis. 4, 35 (1982), ELISA and other solid-phase immunoassays. Theoretical and practical aspects, Eds. D.M.Kemeny, S.J.Challacombe, John Wiley and sons Ltd, Chichester, UK, 1988.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch eine Reihe von unspezifisch reagierenden Faktoren gestört, somit werden falsche Ergebnisse erzielt, oder hoher Background verringert die Empfindlichkeit. (A.H.W.M.Schuurs, B. K.van Weemen, Clinica Chimica Acta 81,1(1977); O.Meumann, in: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 104, New Developments in Virology, Ed.P.A.Bachmann, Berlin, Heidelberg, New York 1983, S.101].

Solche unspezifischen Bindungen und falsche Ergebnisse können durch Rheumafaktoren, die mit aggregiertem IgG reagieren, durch antinukleäre Antikörper, die gegen Kernmaterial verschiedener Antigene gerichtet sind, durch antizelluläre Antikörper, die mit Zellbestandteilen, die in Antigenpräparationen enthalten sind, Reaktionen eingehen können und durch Protein-Rezeptor-Reaktionen während der Bindungsreaktionen der Reaktionspartner hervorgerufen werden.

Die Reduzierung oder Eliminierung von unspezifischen Reaktionen ist deshalb für die Treffsicherheit der Bestimmungen von großem Wert.

Um die unspezifischen Bindungen an den festen Träger zu verringern, schlagen verschiedene Autoren vor, den Verdünnungsflüssigkeiten und Inkubationsmedien fetales Kälberserum, isolierte Proteine oder Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen zuzusetzen (S.Avrames, in: New Developments in Diagnostic Virology, Ed.P.A.Bachmann, Berlin, Heidelberg, New York 1983,S.93; J.Clin.Microbiol. 13, 738(1981); Methods in Enzymology 70, 419 (1980).

Diese angeführten Zusätze während der Bindungsreaktionen reichen nicht immer aus (Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 94,36 (1981), um unspezifische Bindungen in genügendem Maße ohne Beeinträchtigung der spezifischen Immunreaktion zu unterdrücken.

Einige Autoren [J.A. Stewart, D.W.Ziegler, J. Immunol.117,2006(1976); K.O.M.Kalimo, R.J. Marttila, K. Grantors, M.K.Viljanen, Infect.Immun. 15,883 (1978); A.M.Arvin, C.M. Koropchak, J.Clin.Microbiol.12,367(1980)] empfehlen, die im Test verwendeten Immunreaktanden in sehr hoher Reinheit einzusetzen. Dies ist allerdings mit einem sehr hohen Arbeitsaufwand unter Einsatz mehrstufiger Reinigungsprozesse mittels spezieller Technik und in der Regel mit beträchtlichen Ausbeuteverlusten verbunden.

Die Herstellung kompletter Testpackungen, die alle notwendigen, unter standardisierten industriellen Bedingungen gefertigten, spezifisch reagierenden Testbestandteile enthalten und eine störungsfreie routinemäßige Testausführung gestatten, ist für den Anwender der Immunotechniken von besonderem Vorteil, vorausgesetzt, die empfindlichen biologischen, immunologisch aktiven Materialien reagieren mit geringer Störanfälligkeit und behalten über einen langen Zeitraum ihre immunologische Aktivität und sind somit langzeitlager- und versandfähig.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, unspezifische Bindungswechselwirkungen in Immunoassays zur Erfassung immunologisch aktiver Verbindungen, insbesondere klassenspezifischer Antikörper zu reduzieren oder zu eliminieren und eine Langzeitstabilität der empfindlichen immunologisch aktiven Testbestandteile zu erreichen. Auf effektive Weise soll eine Massenproduktion monoklonaler Antikörper ermöglicht werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

65 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Verringerung ungewollt unspezifischer Wechselwirkungen mit koimmobilisierten Bindungsproteinen am beschichteten festen Träger, eine Erniedrigung zwischenmolekularer Bindungsreaktionen zwischen unspezifisch reagierenden Bindungsproteinen und zugehörigen Rezeptoren zu erreichen und Testkits

Lagerung: A. bei -70°C bzw. B. bei 4°C in einer trisgepufferten ($0,020\text{ mol/l}$)- $0,27\text{ mol/l}$ -Natriumchlorid- $0,006\text{ mol/l}$ -Kaliumchlorid-Lösung, die $0,02\text{ Gew.-%}$ Gentamycin, $2,0\text{ Gew.-%}$ Serumprotein vom Rind, $4,6 \times 10^{-4}\text{ mol/l}$ $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO} \cdot \text{HSO}_4\text{K}$, $0,01\text{ Gew.-%}$ Phthalein der $3,3'$ -Dibromphenolsulfonsäure ($\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$), 55 Gew.-% $\text{OHCH}_2 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ enthält.

- 5 b) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je $0,1\text{ ml}$ einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer ($0,05\text{ mol/l}$, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je $0,1\text{ ml}$ von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil sterilen Zubereitungen (sterilfiltriert über Glasfaservorfilter und Zelluloseacetatmembranschicht, Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$) von inaktivierten, verdünnten, [N mit Nonidet NP-40 (1% v/v) vorbehandelten] mit $0,01\%$ (w/v) Gentamycin, $0,01\%$ (w/v) Merthiolat, $0,1\%$ (w/v) $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO} \cdot \text{HSO}_4\text{K}$, $20,0\%$ (w/v) alpha-beta-D-Glucopyranose versetzten, in $2,5\text{-ml}$ -Braunglasflaschen, hydrolytische Klasse 1 mit Schraubverschluß abgefüllten Humanseren mit 100 Teilen trisgepufferter (pH 7,3) [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ($1,2\text{ g/l}$)]-[Trinatriumcitrat-dihydrat ($14,71\text{ g/l}$)]-[Merthiolat ($0,1\text{ g/l}$)]-[Gentamycin ($0,1\text{ g/l}$)]-[Tween 20 ($0,5\text{ g/l}$)]-Tetrabromphenolsulfonphthalein ($0,05\text{ g/l}$)]-[fetale Serum vom Rind ($100,0\text{ g/l}$)]-[Natriumchlorid ($17,53\text{ g/l}$)]-Lösung hergestellt wurden und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten werden $0,1\text{ ml}$ einer Natriumchlorid ($8,7\text{ g/l}$)-Tween 20- ($0,5\text{ g/l}$)-fetale Serum vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter $1:16$ in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

20 Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung $0,1\text{ ml}$ anti-Rubella-POD-Konjugat-Lösung ($0,0002\text{ mg}$ Konjugat/ml Ansatz) und inkubiert 30 min bei 37°C .

Nach dem Waschen werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ einer Tetramethylbenzidin- (1 mmol/l)-Wasserstoffperoxid ($2 \times 10^{-3}\text{ mol/l}$)-Lösung in $0,2\text{ mol/l}$ Citratpuffer (pH 4,0) pipettiert; nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 18 bis 25°C werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ Schwefelsäure (1 mol/l) zugefügt. Durch Vertikalphotometrie wird die Extinktion bei 450 nm ermittelt.

- 25 c) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je $0,1\text{ ml}$ einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer ($0,05\text{ mol/l}$, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je $0,1\text{ ml}$ von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil sterilen Zubereitungen (sterilfiltriert über Glasfaservorfilter und Zelluloseacetatmembranschicht, Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$) von inaktivierten, verdünnten, N mit Nonidet NP-40 (1% v/v) vorbehandelten, mit $0,01\%$ (w/v) Gentamycin, $0,01\%$ (w/v) Merthiolat, $0,1\%$ (w/v) $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO} \cdot \text{HSO}_4\text{K}$, $20,0\%$ (w/v) alpha-beta-D-Glucopyranose versetzten, in $2,5\text{-ml}$ -Braunglasflaschen, hydrolytische Klasse 1 mit Schraubverschluß abgefüllten Humanseren mit 100 Teilen trisgepufferter (pH 7,3) [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ($1,2\text{ g/l}$)]-[Trinatriumcitrat-dihydrat ($14,71\text{ g/l}$)]-[Merthiolat ($0,1\text{ g/l}$)]-[Gentamycin ($0,1\text{ g/l}$)]-[Tween 20 ($0,5\text{ g/l}$)]-Tetrabromphenolsulfonphthalein ($0,05\text{ g/l}$)]-[fetale Serum vom Rind ($20,0\text{ g/l}$)]-[Serum vom Pferd (25 g/l)]-[Serum vom Schaf (50 g/l)]-[Mausserum (5 g/l)]-[Natriumchlorid ($17,53\text{ g/l}$)]-Lösung hergestellt wurden. Die Platten werden 1 h bei 37°C inkubiert.

35 Nach dem Waschen der Platten werden $0,1\text{ ml}$ einer Natriumchlorid ($8,7\text{ g/l}$)-Tween 20- ($0,5\text{ g/l}$)-fetale Serum vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter $1:16$ in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

40 Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung $0,1\text{ ml}$ anti-Rubella-POD-Konjugat-Lösung ($0,0002\text{ mg}$ Konjugat/ml Ansatz) und inkubiert 30 min bei 37°C . Nach erneutem Waschen werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ einer Tetramethylbenzidin (1 mmol/l)-Wasserstoffperoxid ($2 \times 10^{-3}\text{ mol/l}$)-Lösung in $0,2\text{ mol/l}$ Citratpuffer (pH 4,0) pipettiert; nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 18 bis 25°C werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ Schwefelsäure (1 mol/l) zugefügt. Durch Vertikalphotometrie wird die Extinktion bei 450 nm ermittelt.

- 45 d) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je $0,1\text{ ml}$ einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer ($0,05\text{ mol/l}$, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je $0,1\text{ ml}$ von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter, lyophilisierter Präparation von Humanseren in [abgebauten Succinyl- bzw. Furfuryl-Sklero/Bindegewebsproteinen ($30,0\text{ g/l}$)]-[4-(beta-D-Galaktopyranosido)-D-glucopyranose ($50,0\text{ g/l}$)]-[Natriumazid ($1,0\text{ g/l}$)]-[Natriumchlorid ($8,7\text{ g/l}$)]-Lösung (pH 6,5 bis 7,6) mit 100 Teilen trisgepufferter (pH 7,3) [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ($1,2\text{ g/l}$)]-[Trinatriumcitrat-dihydrat ($14,71\text{ g/l}$)]-[Merthiolat ($0,1\text{ g/l}$)]-[Gentamycin ($0,1\text{ g/l}$)]-[Tween 20 ($0,5\text{ g/l}$)]-Tetrabromphenolsulfonphthalein ($0,05\text{ g/l}$)]-[fetale Serum vom Rind ($20,0\text{ g/l}$)]-[Serum vom Pferd (25 g/l)]-[Serum vom Schaf (50 g/l)]-[Mausserum (5 g/l)]-[Natriumchlorid ($17,53\text{ g/l}$)]-Lösung hergestellt wurden und 1 h bei 37°C inkubiert.

55 Nach dem Waschen der Platten werden $0,1\text{ ml}$ einer Natriumchlorid ($8,7\text{ g/l}$)-Tween 20- ($0,5\text{ g/l}$)-fetale Serum vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter $1:16$ in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

60 Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung $0,1\text{ ml}$ anti-Rubella-POD-Konjugat-Lösung ($0,0002\text{ mg}$ Konjugat/ml Ansatz) und inkubiert 30 min bei 37°C .

Nach dem Waschen werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ einer Tetramethylbenzidin- (1 mmol/l)-Wasserstoffperoxid ($2 \times 10^{-3}\text{ mol/l}$)-Lösung in $0,2\text{ mol/l}$ Citratpuffer (pH 4,0) pipettiert; nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 18 bis 25°C werden je Vertiefung $0,1\text{ ml}$ Schwefelsäure (1 mol/l) zugefügt. Durch Vertikalphotometrie wird die Extinktion bei 450 nm ermittelt.

65

DE 196 48 629 A 1

	Extinktion 450 nm		
	Konjugat 1a, Lagerung A, nach 12 Monaten	Konjugat 1a, Lagerung B nach 12 Monaten	
P, Beispiel 1b	1,803	1,625	5
N, Beispiel 1b	0,220	0,270	
P/N-Quotient	8,2	6,0	
P, 1b nach 12 Monaten 4 °C	1,750	1,590	10
N, 1b nach 12 Monaten 4 °C	0,230	0,250	
P/N-Quotient	7,6	6,4	
P, Beispiel 1c	1,925	1,765	15
N, Beispiel 1c	0,090	0,146	
P/N-Quotient	21,4	12,1	
P, 1c nach 12 Monaten 4 °C	1,874	1,724	20
N, 1c nach 12 Monaten 4 °C	0,110	0,128	
P/N-Quotient	17,0	13,5	
P, Beispiel 1d	1,698	1,702	25
N, Beispiel 1d	0,145	0,155	
P/N-Quotient	11,7	11,0	
P, 1d nach 12 Monaten 4 °C	1,703	1,650	30
N, 1d nach 12 Monaten 4 °C	0,105	0,163	
P/N-Quotient	16,2	10,1	

Beispiel 2

- a) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanserum, gefriergetrocknet in [Phosphat (0,01 mol/l)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[Serumproteine vom Rind (70,0 g/l)]-[alpha-D-Glucopyranosido-beta-D-fructo-furanosid (100,0 g/l)]-[Natriumazid (1,0 g/l)]-Lösung bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03/90" [B. Pustowoit, B. Meisegeier u. a., Klin. Lab. 38, 280-285 (1992)] bzw. 1 Teil Patientenserum (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolsulfonphthalein; chinoide Form, Na-Salz (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.
- Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer Natriumchlorid (8,7 g/l)-Tween 20-(0,5 g/l)-fetalen Serums vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.
- Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,005 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).
- Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.
- Man saugt ab, wäscht und pipettiert in jede Vertiefung 0,1 ml einer Lösung von 4-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Diethanolamin (1 mol/l, pH 9,8) und läßt 30 min bei 37°C reagieren. Nach Zufügen von 0,1 ml Natriumhydroxid-Lösung in jede Vertiefung wird mittels Vertikalphotometrie bei 405 nm die spezifische Extinktion ermittelt.
- b) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanserum, gefriergetrocknet in [Phosphat (0,01 mol/l)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[Serumproteine vom Rind (70,0 g/l)]-[alpha-D-Glucopyranosido-beta-D-fructo-furanosid (100,0 g/l)]-[Natriumazid (1,0 g/l)]-Lösung bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03190" (B. Pustowoit, B. Meisegeier u. a., Klin. Lab. 38, 280-285 (1992)] bzw. 1 Teil Patientenserum (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolsulfonphthalein (0,02 g/l)]-Lösung herge-

stellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert. Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer Natriumchlorid (8,7 g/l)-Tween 20- (0,5 g/l)-fetalen Serums vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0006 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und pipettiert in jede Vertiefung 0,1 ml einer Lösung von 4-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Diethanolamin (1 mol/l, pH 9,8) und läßt 30 min bei 37°C reagieren. Nach Zufügen von 0,1 ml Natriumhydroxid-Lösung in jede Vertiefung wird mittels Vertikalphotometrie bei 405 nm die spezifische Extinktion ermittelt.

c) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet wie beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03/90" bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolsulfonphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer Natriumchlorid (8,7 g/l)-Tween 20-(0,5 g/l)-fetalen Serums vom Rind (100 g/l)-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

d) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet wie beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolsulfonphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20-(0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

e) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierenden (P) bzw. -negativ-reagierenden (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet wie beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03190" bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolsulfonphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20- (0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-

DE 196 48 629 A 1

[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

f) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet wie beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03190" bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum von der Maus (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20-(0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum von der Maus (10,0 g/l)]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum von der Maus (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

g) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet, wie oben beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03/90" bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert. Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20- (0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (90,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

h) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten in bekannter Art und Weise werden in die Vertiefungen der Platten je 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien pipettiert, die durch Verdünnen von 1 Teil resuspendierter Zubereitung anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien aus Humanseren, gefriergetrocknet, wie oben beschrieben bzw. 1 Teil resuspendierten anti-Röteln-IgM-Vergleichsstandards (S) "Leipzig 03190" bzw. 1 Teil Patientenseren (PS) mit 100 Teilen [Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (69,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Serum von der Maus (1,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Tetrabromphenolphthalein (0,02 g/l)]-Lösung hergestellt wurde und 1 h (37°C) inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20- (0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (69,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Serum von der Maus (1,0 g/l)]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämagglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (69,0 g/l)]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Serum von der Maus (1,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

i) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer beschichtet, inkubiert und gewaschen wie beschrieben.

Es werden 0,1 ml von Mischungen anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien, hergestellt durch Verdünnen von 1 Teil sterilen Zubereitungen (sterilfiltriert über Glasfaservorfilter

und Zelluloseacetatmembranschicht, Porengröße 0,2 µm) von inaktivierten, [N mit Nonidet NP-40 (1% v/v) vorbehandelten], mit 0,01% (w/v) Gentamycin, 0,01% (w/v) Merthiolat, 0,1% (w/v) C₉H₇NO · HSO₄K, 30,0% (w/v) alpha-D-Glucopyranosido-beta-D-fructo-furanosid versetzt, in 2,5-ml-Braunglasflaschen, hydrolytische Klasse 1 mit Schraubverschluß abgefüllten Humanseren mit 100 Teilen trisgcpufferter (pH 7,3)-[Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (1,2 g/l)]-[Trinatriumcitrat-dihydrat (14,71 g/l)]-[Merthiolat (0,1 g/l)]-[Gentamycin (0,1 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-[Dichlorphenolsulfonphthalein (3×10⁻⁴ mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (59,0 g/l)]-[Serum vom Pferd 10,0 g/l]-[Serum von der Maus 1,0 g/l]-[Serum von der Ziege 10,0 g/l]-[Serum vom Schaf 10,0 g/l]-[Serum vom Menschen 10,0 g/l]-[Natriumchlorid (17,53 g/l)]-Lösung hergestellt wurden und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten werden 0,1 ml einer [Natriumchlorid (8,7 g/l)]-[Tween 20- (0,5 g/l)]-[fetalen Serums vom Rind (59,0 g/l)]-[Serum vom Pferd 10,0 g/l]-[Serum von der Maus 1,0 g/l]-[Serum von der Ziege 10,0 g/l]-[Serum vom Schaf 10,0 g/l]-[Serum vom Menschen 10,0 g/l]-Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (Hämaggglutinationstiter 1 : 16 in der gebrauchsfertigen Lösung) enthält, pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Waschen der Platten füllt man in jede Vertiefung 0,1 ml [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,0025 mg/ml)]-[anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,0003 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (59,0 g/l)]-[Serum vom Pferd 10,0 g/l]-[Serum vom Schaf (10,0 g/l)]-[Serum von der Ziege (10,0 g/l)]-[Serum vom Menschen (10,0 g/l)]-[Serum von der Maus (1,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung und inkubiert 1 h (37°C).

Die Platten werden in bekannter Weise gewaschen, und jede Vertiefung wird mit 0,1 ml [Streptavidin, markiert mit alkalischer Phosphatase (0,00031 mg/ml)]-[Natriumchlorid (0,13 mol/l)]-[fetalen Serums vom Rind (100,0 g/l)]-[Tween 20 (0,5 g/l)]-Lösung beschickt. Die Platten werden 1 h (37°C) inkubiert.

Man saugt ab, wäscht und ermittelt die spezifische Aktivität, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

Beispiel 3

a) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer beschichtet, inkubiert und gewaschen wie beschrieben.

Es werden 0,1 ml von Mischungen (1 + 100) anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien inkubiert wie beschrieben.

Nach dem Waschen in üblicher Weise läßt man 0,1 ml einer Mischung aus 1 Teil Röteln-Antigen-Präparation (Hämaggglutinationstiter 1 : 64), 1 Teil [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,015 mg/ml)], 1 Teil [anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,002 mg/ml)] und 1 Teil, bestehend aus Serum vom Menschen (anti-Rubella-negativ, 10,0 g/l), Serum von der Ziege (10,0 g/l), Serum von der Maus (0,1 g/l), Serum vom Pferd (1 g/l), Ethylendiamintetraessigsäure-di-Na-salz (0,0006 mol/l) in Natriumchlorid (0,13 mol/l)-Serum vom Rind (100,0 g/l)-Tween 20 (0,5 g/l)-Bromphenolblau (20 mg/l)-Lösung (pH 6,5 bis 7,2), 1 h bei 37°C einwirken, wäscht und weist nach Inkubation des Streptavidin-Konjugates die spezifische Aktivität nach, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

b) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von anti-human-IgM in Carbonatpuffer beschichtet, inkubiert und gewaschen wie beschrieben.

Es werden 0,1 ml von Mischungen (1+100) anti-Röteln-IgM-positiv-reagierender (P) bzw. -negativ-reagierender (N) Kontrollmaterialien inkubiert wie beschrieben.

Nach dem Waschen läßt man 0,1 ml einer Mischung aus 1 Teil Röteln-Antigen-Präparation (Hämaggglutinationstiter 1 : 64), 1 Teil [anti-Rubella-Antikörper-B1-Biotin-Derivat (0,015 mg/ml)], 1 Teil [anti-Rubella-Antikörper-B2-Biotin-Derivat (0,002 mg/ml)] und 1 Teil, bestehend aus Serum vom Menschen (anti-Rubella-negativ, 5,0 g/l), Serum von der Ziege (10,0 g/l), Serum von der Maus (0,01 g/l), Serum vom Pferd (0,1 g/l), Ethylendiamintetraessigsäure-di-Na-Salz (0,0012 mol/l) in Natriumchlorid (0,13 mol/l)-Serum vom Rind (100,0 g/l)-Tween 20 (0,5 g/l)-Lösung (pH 6,5 bis 7,2), 1 h bei 37°C einwirken, wäscht und weist nach Inkubation des Streptavidin-Konjugates die spezifische Aktivität nach, wie unter Beispiel 2a beschrieben.

Der Vergleich der Extinktionen der Vertikalphotometrie zeigt die Wirksamkeit der Verfahrensweise.

Extinktionen 405 nm

Beispiele

2a-g

2h,l

3a,b

P

1,7-1,9

1,6-2,0

1,2-1,5

N

0,35-0,8

0,05-0,2

0,1-0,2

S

2,5-2,8

2,5-2,8

1,8-2,5

PS

2,0-2,5

2,0-2,5

1,6-2,0

Beispiel 3

Zur Produktion der anti-Rubella-Antikörper werden die DNA aus den Hybridomzellen Sifin-Rub-A1-58E10 (ZIM-Nr. 0504), Sifin-Rub-B1-12F10 (ZIM-Nr. 0505) bzw. Sifin-Rub-B2-18D10 (ZIM-Nr. 0506) isoliert, indem 0,5 ml Puffer-Hybridomzellgemisch mit 5 ml Isolierungspuffer (25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5) gemischt und kräftig geschüttelt werden. Man fügt 50 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg Proteinase K in 1 ml Wasser) und 0,3 ml einer 20%igen Natriumdodecylsulfat-Lösung zu, inkubiert über Nacht bei 37°C und zentrifugiert bei 4000 × g 10 Minuten.

DE 196 48 629 A 1

Der Überstand wird mit 2 Volumen absol. Ethanol versetzt. Man gewinnt die DNA und löst in 1 ml Tris/HCl-Puffer (10 mM Tris/1mM EDTA).

Vom versierten Fachmann werden die spezifischen DNA-Fragmente gewonnen. Unter Verwendung kommerzieller Kits erfolgt die Ligation der DNA in den Vektor entsprechend Vorschriften der Kit-Hersteller.

Anschließend wird das Transportvehikel in das Wirtssystem, Bakterienzelle E. coli, die kommerziell erhältlich sind, bei 28–30°C transferiert, wobei der Hitzeimpuls für 5 min bei 34°C erfolgt. Diese Prozedur kann relativ leicht vom Fachmann ausgeführt werden.

Die Kultivierung der E.coli-Bakterien wird in kommerziell erhältlichen Selektionsmedien über 5 bis 28, vorzugsweise 3-8 Stunden durchgeführt. Bei einer Zelldichte von 0,7 A (578)/ml wird die Kultur zur Induktion der Genexpression im Wasserbad bei 42°C unter Schütteln inkubiert.

Nach ggf. Ultraschallbehandlung (20–25 Pulse/min mit jeweils 1 min Pause bei einer Leistung von 80 W) werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt.

Ein Teil Kulturlösung wird unter Rühren mit einem Teil gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bei 18 bis 25°C gemischt. Nach Zentrifugation bei 2000 U/min wird der Niederschlag in Natriumchlorid-Lösung (0,9 g/l) gelöst und gegen Tris-Puffer über 2 Tage bei 4°C dialysiert. Durch Chromatographie erfolgt auf bekannte Art und Weise die Reindarstellung der anti-Rubella-Antikörper.

Patentansprüche

1. Verfahren zum immunologischen Nachweis oder zur Bestimmung von erregerspezifischen Plasmaproteinen mit Antikörperaktivität unterschiedlicher Isotypie, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch synergistisch-supraadditive Effekte biologischer Substanzen, vorzugsweise von Warmblütern unterschiedlicher Species auf der Basis von Bindungs- und/oder Konkurrenz- und/oder Verdrängungs- und/oder Blockierungsreaktionen unspezifischer Faktoren ungewollte unspezifische Reaktionen unterdrückt und eigentümliche, kennzeichnende Eigenschaften hervorgehoben werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise isotypspezifische Antikörper gegen Rubella-Virus erfaßt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung der Antikörper gegen Rubella-Virus ein Festphasenimmunoassay dient und an die feste Phase ein Immunglobulin mit anti-isotypischen Determinanten, das Rezeptoren zu Antigenbindungsstellen von Substrukturen humaner Immunglobuline besitzt, gebunden ist.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Immunoassay die monoklonalen Antikörper Sifin-Rub B1–2 F10 [Z1], Sifin-Rub B2–18 D10 [Z2] einzeln oder als Kombination oder daß Spaltprodukte oder Kombinationen von Spaltprodukten dieser Antikörper oder daß aus den Hybridomaursprungszellen, die diese Antikörper produzieren, gentechnisch gewonnene Polypeptide eingesetzt werden, die die Antigen-determinierenden analogen Strukturbereiche der Antikörper Sifin-Rub B1–2 [Z1] und Sifin-Rub B2–18 [Z2] aufweisen und analoge Bindungsreaktionen eingehen.
5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der isotypspezifischen Antikörper folgende Stufen umfaßt:
 - a) Umsetzung der Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper X, der Rezeptoren zu den Determinanten von W und gleichzeitig Determinanten zu Epitopen der Virusantigene Y vom Rubella-Virus besitzt, mit dem festphasenfixierten Protein W auf bekannte Art und Weise;
 - b) Entfernung nichtgebundener Bestandteile und Einwirkung des Virusmaterials Y oder von Spaltprodukten des Virusmaterials Y oder von chemo- oder gentechnisch gewonnenen sequenzanalogen Strukturen des Materials Y, das Epitope zu den Polypeptiden Z1/Z2 (Sifin-Rub B1–12 D10, Sifin-Rub 2–18 F10) besitzt,
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile, Einwirkung markierter Polypeptide Z oder einer Kombination der markierten Polypeptide Z1/Z2 oder einer Kombination von Polypeptidfragmenten Z1/Z2, die Determinanten zu Y aufweisen oder Einwirkung der Polypeptide Z1/Polypeptide Z2 (einzeln oder in Kombination) mit nachfolgender Einwirkung von Proteinen, vorzugsweise markiert, die Rezeptoren zu Determinanten der Eiweißkörper von Z [Z1/Z2] haben und Manifestation des markierten gebundenen Anteils auf bekannte Art und Weise.
6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der isotypspezifischen Antikörper folgende Stufen umfaßt:
 - a) Umsetzung der Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper X, der Rezeptoren zu den Determinanten von W und gleichzeitig Determinanten zu Epitopen der Virusantigene Y vom Rubella-Virus besitzt, mit dem festphasenfixierten Protein W auf bekannte Art und Weise;
 - b) Entfernung nichtgebundener Bestandteile und Einwirkung des Virusmaterials Y oder von Spaltprodukten des Virusmaterials Y oder von chemo- oder gentechnisch gewonnenen sequenzanalogen Strukturen des Materials Y, das Epitope zu den Polypeptiden Z1/Z2 (Sifin-Rub B1–12, Sifin-Rub 2–18) besitzt, in Kombination mit Polypeptiden Z1/Z2 (einzeln oder kombiniert) oder Polypeptid-Z1-Bindungsprotein-V-Derivaten/Polypeptiden-Z2-Bindungsprotein V-Derivaten, wobei die Polypeptide einzeln oder kombiniert eingesetzt werden, und das Bindungsprotein V Affinitäten zu einem weiteren Bindungsprotein U, das vorzugsweise markiert sein kann, aufweist.
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile, Einwirkung des Bindungsproteins U, vorzugsweise markiert und Manifestation des markierten gebundenen Anteils auf bekannte Art und Weise.
7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der isotypspezifischen Antikörper folgende Stufen umfaßt:
 - a) Umsetzung der Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper X, der Rezeptoren zu den Determinanten von W und gleichzeitig Determinanten zu Epitopen der Virusantigene Y vom Rubella-Virus

besitzt, mit dem festphasenfixierten Protein W auf bekannte Art und Weise;

b) Entfernung nichtgebundener Bestandteile und Einwirkung einer Mischung aus Virusmaterial Y oder von Spaltprodukten des Virusmaterials Y oder von chemo- oder gentechnisch gewonnenen sequenzanalogen Strukturen des Materials Y, das Epitope zu den Polypeptiden Z1/Z2 (Sifin-Rub B1-12, Sifin-Rub 2-18) besitzt, von Polypeptiden Z1/Z2 (einzeln oder kombiniert) oder Polypeptid-Z1-Bindungsprotein-V-Derivaten/Polypeptid-Z2-Bindungsprotein-V-Derivaten, und des Bindungsproteins U, das vorzugsweise markiert ist;

c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile, Manifestation des markierten gebundenen Anteils auf bekannte Art und Weise.

8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der isotypspezifischen Antikörper in folgender Weise erfolgt: Kontakt eines immobilisierten Proteins W mit einer Mischung, die aus einer Probe, die den nachzuweisenden Antikörper X enthält, der Rezeptoren zu den Determinanten von W und zu Y besitzt, einer Virussubstanz Y oder aus dem Spaltprodukt der Virussubstanz Y und dem markierten Polypeptid Z oder einer Kombination markierter Fragmente der Polypeptide Z besteht und Manifestation der gebundenen markierten Anteile auf bekannte Art und Weise.

9. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der isotypspezifischen Antikörper in folgender Weise erfolgt: Kontakt eines immobilisierten Proteins W mit einer Mischung, die aus einer Probe, die den nachzuweisenden Antikörper X enthält, der Rezeptoren zu den Determinanten von W und zu Y besitzt, einer Virussubstanz Y oder aus dem Spaltprodukt der Virussubstanz Y und dem Polypeptiden Z-Bindungsproteine-V-Derivaten (Polypeptide Z: einzeln oder in Kombination bzw. als Fragmente) und dem Bindungsprotein U, das vorzugsweise markiert ist, besteht und Manifestation der gebundenen markierten Anteile auf bekannte Art und Weise.

10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polypeptide Z (Sifin-Rub B1-12, Sifin-Rub B 2-18) markiert sind.

11. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindungsprotein U markiert ist bzw. sich mit einem Marker umsetzen kann.

12. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen mit einem Enzym markiert sind.

13. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen mit einem Lumineszenzmarker markiert sind.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym alkalische Phosphatase ist.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym Meerrettichperoxidase ist.

16. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym β -Galactosidase ist.

17. Verfahren nach Ansprüchen 6, 7 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindungsprotein V vorzugsweise Biotin ist.

18. Verfahren nach Ansprüchen 6, 7 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindungsprotein U vorzugsweise Streptavidin oder ein reaktionsanaloges Protein ist.

19. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung der Antikörper gegen Rubella-Virus ein Immunoassay mit spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktion und netzwerkartiger Verknüpfung der Reaktanden dient.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß im Immunoassay die monoklonalen Antikörper Sifin-Rub A1-58 E 10, Sifin-Rub B1-2 F10 [Z1], Sifin-Rub B2-18 D10 [Z2] einzeln oder als Kombination oder daß Spaltprodukte oder Kombinationen von Spaltprodukten dieser Antikörper oder daß aus den Hybridomaursprungszellen, die diese Antikörper produzieren, gentechnisch gewonnene Polypeptide eingesetzt werden, die die Antigen-determinierenden analogen Strukturbereiche der Antikörper Sifin-Rub A1 58 E 10, Sifin-Rub B1 2 [Z1] und Sifin-Rub B2-18[Z2] aufweisen und analoge Bindungsreaktionen eingehen.

21. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise Serumbestandteile unterschiedlicher Species mit gegenseitig unterstützender Wirkung eingesetzt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß vorzugsweise Serumbestandteile von Warmblütern in einer Konzentration von 0,0015 mg bis 0,7 mg Protein/ 100 μ l-Ansatz verwendet werden.

23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Serumbestandteile während der Inkubation jedes einzelnen Reaktionspartners, vorzugsweise bei der Inkubation von Mischungen der Reaktionspartner zugesetzt werden.

24. Verfahren zur Produktion monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß genetische Informationen der Hybridome Sifin-Rub-A1-58E10, Sifin-Rub-B1-12, Sifin-Rub-B2-18D10, die die Synthese monoklonaler anti-Rubella-Antikörper bewirken, auf geeignete Wirtszellen, vorzugsweise E.coli, übertragen werden und anschließend die Wirtsstämme kultiviert, und die spezifischen Proteine isoliert werden.

25. Verfahren zum immunologischen Nachweis oder zur Bestimmung von erregerspezifischen Proteinen mit Antikörperaktivität oder von Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß der Kontakt eines immobilisierten Proteins, das Rezeptoren A zu dem nachzuweisenden Analyten aufweist, mit dem Analyten und nachfolgend mit einem Bindungsprotein, das Epitope zu Rezeptoren B des Analyten und zu den Rezeptoren C des nachfolgenden festphasengebundenen Bindungspolypeptids bzw. zu Bindungspolypeptiden besitzt und nachfolgend mit dem festphasengebundenen Bindungspolypeptid/mit den Bindungspolypeptiden erfolgt oder daß ein Analyt, der Epitope zu den Bindungspolypeptiden besitzt, mit Bindungspolypeptiden einzeln oder in Kombination umgesetzt wird, wobei die Bindungspolypeptide aus einem Zellklon produziert wurden, und der Grad der Reaktion auf an und für sich bekannte Art und Weise visuell oder instrumentell ausgewertet wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindungspolypeptid/die Bindungspolypeptide an Polystyrol gebunden ist/sind.

27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Brückenbildung des multivalenten Bindungsproteins mit den Determinanten des Bindungspolypeptids/der Bindungspolypeptide eintritt und der Grad der ge-

DE 196 48 629 A 1

samen Bindungsreaktionen und Vernetzungsreaktionen visuell oder instrumentell auf bekannte Art und Weise erfaßt wird.

28. Testpackung zur Erfassung von erregerspezifischen Plasmaproteinen mit Antikörperaktivität unterschiedlicher Isotypie, dadurch gekennzeichnet, daß sie außer den Immunreaktanden Bestandteile enthält, die durch Bindungs- und/oder Konkurrenz- und/oder Verdrängungs- und/oder Blockierungsreaktionen unspezifischer Faktoren ungewollte unspezifische Reaktionen unterdrücken und Substanzen A, die die allgemeine Zusammensetzung $[\text{HOC}_9\text{H}_3(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3)\text{N}]^+\text{X}^-$ haben und benzokondensierte Ringsysteme des Pyridins sind, Polyhydroxyverbindungen und Substanzen B, die substituierte Triarylmethyl-derivate darstellen, enthalten sind.

29. Testpackung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß in den Substanzen A die Reste R_1 , R_2 , R_3 , X folgende Substituenten repräsentieren: R_1 steht für H, Cl oder F und R_2 für H, Cl, J oder F und R_3 für H oder einen Oxy-benzoesäuremethylester-Rest, X stellt einen anorganischen Säurerest dar, vorzugsweise werden die Alkalisalze der Sulfate in einer Konzentration von 0,006 bis 0,5% eingesetzt.

30. Testpackung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Substanz B die Phthaleine der Phenol- oder Kresol- oder Thymolsulfonsäuren eingesetzt werden.

31. Testpackung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die unsubstituierten oder vorzugsweise die 3'-, 3'', 5'-, 5''- brom- und/oder chlosubstituierten Derivate verwendet werden.

32. Testpackung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen in der anionischen Form, vorzugsweise als Alkalisalze in einer Konzentration von 0,001 bis 0,3% eingesetzt werden.

- Leerseite -